Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 3, Fall 2019, p. 365-375

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 11، شماره 3، پاییز 1398، ص. 375-365

تجزیه و تحلیل ژنوتیپی ناحیه‌ی کمپلکس اصلی سازگاری بافتی در مرغ‌های بومی ایران

جعفر پیش‌جنگ آقاجری[1*]، قدرت‌اله رحیمی میانجی[2]، سید حسن حافظیان[3]، محسن قلی‌زاده[4]، قربان الیاسی[5]

تاریخ دریافت: 1397/01/20
تاریخ پذیرش: 1397/03/31

چکیده

ناحیه‌ی MHC مرغ‌ها در پاسخ‌های ایمنی، مقاومت به بیماری‌ها و فرایندهای تکاملی، دارای اهمیت است. در این تحقیق 200 نمونه‌ی خونی از مرغ‌های بومی نژادهای عمومی، آذربایجان غربی، مرندی و مازندرانی اخذ شد و DNAی ژنومی به روش بهینه شده‌ی نمکی استخراج و چندشکلی‌های آللی در جایگاه‌های ژنی B-L، B-F و B-G با استفاده از تکنیک PCR-RFLP بررسی شد. برای شناسایی جهش در جایگاه‌های ژنی یاد شده از آنزیم *Msp I* استفاده شد. در جایگاه ژنی 374 جفت بازی B-L، فقط ژنوتیپ BB اما در جایگاه ژنی 1048 جفت بازی B-F، دو ژنوتیپ CG و GG شناسایی شد. در این جایگاه آلل C شامل باندهای 515، 410، 75 و 47 جفت بازی و آلل G نیز دارای باندهای 410، 302، 213، 75 و 47 جفت بازی بودند. در جایگاه ژنی 401 جفت بازی B-G، سه ژنوتیپ MM، MN و NN و دو آلل M شامل یک باند 401 جفت بازی و آلل N دارای باندهای 350 و 51 جفت بازی مورد شناسایی قرار گرفت. در کل جمعیت‌ها شاخص اطلاعات شانون در دو جایگاه ژنی B-F و B-G به ترتیب 0/37 و 0/59 و شاخص تثبیت به ترتیب 0/13- و 0/17- محاسبه شدند. بیشترین مقدار شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه‌های ژنی یاد شده به ترتیب 0/25 و 0/48 برآورد شد. با توجه به وجود چندشکلی در دو جایگاه ژنی B-F و B-G، می‌توان با استفاده از پاسخ ایمنی ژنوتیپ‌های مشاهده شده، از این جایگاه‌ها به عنوان نشانگر برای اصلاح نژاد ژنتیکی جهت افزایش مقاومت مرغ‌های بومی به بیماری‌ها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: چندشکلی، کمپلکس اصلی سازگاری بافتی، مرغ بومی، PCR-RFLP.

مقدمه

پرورش طیور در کشور ما و گسترش آن سابقه‌ی طولانی دارد. کشور بزرگ ایران قبل و بعد از میلاد، از هند تا دریاهای سیاه و مدیترانه گسترده بود و در مسیر تقاطع راه‌های حمل و نقل خشکی و دریایی برای حمل و نقل محصولات متنوع از جمله طیور قرار داشت. وجود جنگ‌های متعدد در ایران و اطراف آن، باعث تسهیل گسترش طیور به نقاط مختلف شد. بقایای یافت شده از کاوش‌های باستان شناسی در مناطق مختلف (تپه یحیی و تخت سلیمان)، پرورش و نگهداری طیور در زمان‌های قدیم را تأیید می‌کنند (19). از سوی دیگر امروزه اصلاح نژاد بیشتر روی صفات تولیدی متمرکز شده است و برای مدیریت بیماری‌ها عملاً از داروها استفاده می‌شود و نتایج این‌گونه راهبردها کاهش پتانسیل ژنتیکی مقاومت یا تحمل حیوانات در مقابل عوامل عفونت‌زا است. درحالی‌که واقعیت امر باید افزایش مقاومت ژنتیکی حیوانات در مقابل انگل‌ها، کرم‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها باشد (11). با این حال لازم است با استفاده از روش‌های مولکولی، تنوع پاسخ ایمنی و مقاومت به بیماری مورد بررسی قرار گیرند. پاسخ ایمنی از طریق مقابله‌ی سلول‌های دخیل در ایمنی با عوامل عفونت‌زای مهاجم بروز می‌کند و سلول‌های آلوده و سلول‌هایی که در مهار این آلودگی و تولید آنتی‌ژن‌ها نقش دارند با لنفوسیت‌ها هماهنگی دارند (24). واسطه‌ی اصلی در برقراری ارتباط بین سلول‌های ایمنی و پروتئین‌های غشاء، مولکول‌های وراثتی از جمله کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC)، گیرنده‌های سلولی T (TcR) و ایمونوگلوبولین‌ها (گیرنده‌های سلولی B) و پروتئین‌هایی مثل سایتوکین‌ها و آنتی‌بادی‌ها هستند (6، 8، 14). کمپلکس اصلی سازگاری بافتی برای تعداد زیادی از ژن‌ها به خوبی شناسایی شده است و تنوع آللی آن در بیشتر مهره‌داران گزارش شده است (25). این ژن‌ها شامل سه کلاس هستند که از آن‌ها ژن‌های کلاس I و II

1- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.
2، 3 و 4- به ترتیب استاد، دانشیار و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده‌ی علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
5- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران.
(* - نویسنده مسئول: parsa20012003@yahoo.com)
Doi:10.22067/ijasr.v11i3.71958

بسیار چندشکل هستند (2، 25). ژن‌های بسیار چندشکل کمپلکس اصلی سازگاری بافتی نقش اساسی در تشخیص ایمنی پاتوژن‌ها و پارازیت‌ها بازی می‌کنند (2). در مرغ‌ها ارتباط بین چندشکلی MHC و مقاومت و یا حساسیت در مقابل بیماری‌ها در پژوهش‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. در اغلب گزارش‌های ارائه شده ارتباط بین MHC با مقاومت و یا حساسیت به عوامل عفونت‌زای خاص مثل بیماری مارک مشخص شده است (36). در طیور مهم‌ترین و مؤثرترین ژن‌های کنترل کننده‌ی مقاومت نسبت به بیماری‌ها در کمپلکس اصلی سازگاری بافتی قرار دارند (26). این مجموعه‌ی ژنی در گونه‌های دیگر نیز مولکول‌هایی را کد می‌کند که مسئول عرضه‌ی آنتی‌ژن در سطح سلول‌ها هستند (30). MHC در طیور (مجموعه‌ی B) به شکلی بسیار متراکم روی بازوی کوتاه میکروکروموزوم شماره‌ی 16 قرار دارد و تنها ژن‌های ضروری را داشته و شامل دو جایگاه ژنتیکی B وY- Rfp است که توسط یک ناحیه‌ی غنی و تکراری از ژن‌های کد کننده‌ی RNAی ریبوزومی از یکدیگر جدا شده‌اند (15). جایگاه B در طیور شامل سه کلاس یک، دو و چهار (I، II و IV) که به ترتیب با نام‌هایBF، BL و BG معروف است. مولکول‌های کلاس Iو II تنوع بالایی داشته و مسئول عرضه‌ی آنتی‌ژن‌های داخلی و خارجی به لنفوسیت‌های T هستند (6، 15). ژن‌های MHC با مقاومت یا حساسیت به برخی از بیماری‌های خود ایمن، ویروسی، باکتریایی و انگلی مرتبط هستند. بسیاری از خصوصیات دیگر غیر وابسته به سیستم ایمنی نیز، مثل میزان تولید در دام‌ها، توسط مجموعه‌ی ژنی MHC کنترل می‌شوند. ژن‌های MHC در مرغ‌ها، جهت انتخاب لاین‌های مقاوم به بیماری‌ها با پاسخ دهی بهتر به واکسن‌ها و انتخاب ویژگی‌های پرورشی مؤثر مثل تولید تخم‌مرغ، وزن بدن، میزان جوجه درآوری و باروری مورد توجه قرار می‌گیرند (7). به دلیل نقش کلیدی ژن‌های MHC مرغ‌ها در پاسخ‌های ایمنی، ارتباط با بیماری‌های عفونی و تنوع آن‌ها در ارتباط با تکامل، در دو دهه‌ی اخیر مطالعات زیادی بر روی این ژن‌ها انجام شده است (21). همچنین ارتباط بین ژن‌های MHC با مقاومت یا حساسیت نسبت به برخی از عوامل بیماری‌زا مانند ویروس عامل بیماری مارک (1)، ویروس عامل بیماری بورس عفونی (4)، ویروس تومور سارکومای روس (29)، ویروس عامل نیوکاسل (13)، ویروس لوکوز پرندگان (31)، ویروس عامل آنفلوانزای ماکیان (3، 9) و باکتری‌هایی مثل استافیلوکوک و سالمونلا (10) شناخته شده است.

کیو و همکاران (33) مطالعه‌ای را روی چندشکلی آلل‌های ژن B-L در منطقه‌ی ژنی MHC در مرغ‌های بومی چینی انجام دادند. بعد از تعیین ژنوتیپ به روش PCR-SSCP برای مناطق ژنی 175 جفت بازی و 374 جفت بازی هرکدام به تعداد 30 نمونه انتخاب شده و تعیین توالی شدند. بعد از تجزیه و تحلیل داده‌ها، 31 آلل مختلف بین مرغ‌های بومی چینی مشخص و جایگزینی نوکلئوتیدی برای اولین و دومین جایگاه ژنی به ترتیب 36/76 و 35/29 درصد بود. تشابه توالی برای 31 آلل مختلف نیز در حدود 99/5-90/6 درصد محاسبه شده بود. سیوارامن و کومار (28) چندشکلی جایگاه ژنی B-L به طول 267 جفت باز را با استفاده از سه نوع آنزیم برشی *Hae III*، *Msp I* و *Taq I* روی دو نوع لاین مرغ‌های گوشتی، مورد بررسی قرار دادند که الگوهای برشی مونومورف مشاهده شده بود. همچنین اوه و همکاران (22) اثرات ژنوتیپی جایگاه ژنی B-L را روی صفات اقتصادی مرغ‌های بومی کره‌ای مورد بررسی قرار داده بودند و دو منطقه از این جایگاه ژنی را به طول‌های 427 و 651 جفت باز را تکثیر و با آنزیم برشی *Hae III* برش داده و در نتایج تحقیق خود برای هر جایگاه ژنی، سه نوع ژنوتیپ شناسایی شد. در جایگاه ژنی اول ژنوتیپ TC بیشترین فراوانی (0/8) و در منطقه دوم، ژنوتیپ Mn دارای بیشترین فراوانی (0/88) بود. طبق بررسی‌های آن‌ها ژنوتیپ‌های CC و Mn با صفت وزن بدن در 150 روزگی همبستگی معنی‌داری داشتند.

لیما روزا و همکاران (12) مطالعه‌ای را در 100 قطعه از مرغ بومی برزیلی تخم آبی برای تعیین تغییرات توالی 1048 جفت بازی جایگاه ژنی B-F انجام داده بودند. طبق نتایج به دست آمده در این پژوهش 23 توالی شناسایی که ده تا از توالی‌ها به عنوان توالی جدید گزارش شده بودند. نیکبخت بروجنی و برجسته (21) تنوع ژنتیکی جایگاه ژنی B-F را با استفاده از تکنیک PCR-SSCP در 65 نمونه‌ی DNA شامل 25 نمونه متعلق به جمعیت مادر و 40 نمونه از مرغ‌های تجاری گوشتی آرین مورد بررسی قرار داده بودند. در هر دو جمعیت هفت الگوی مختلف مشخص شد که دو الگو در دو جمعیت مشابه و پنج الگوی دیگر به عنوان الگوی جدید شناسایی شدند.

رای فو و همکاران (23) مطالعه‌ای جهت بررسی چندشکلی ژنتیکی اگزون شماره‌ی دو منطقه‌ی ژنی B-G در هشت نژاد مختلف از مرغ‌های بومی چینی (تیبتان، لانگشان، سیلکی، خیانجو، گیوشی، ایرلوبس سفید، بیجینق و نژاد جنگی) انجام داده بودند. جایگاه ژنی در 557 نمونه تکثیر و تعین توالی شد و 31 آلل جدید شناسایی شد. کیو و همکاران (32) تحقیقی را با استفاده از دو نوع آنزیم برشی روی منطقه‌ی ژنی B-G در هشت نژاد مختلف از مرغ‌های بومی و هیبرید گوشتی انجام دادند. از 381 نمونه‌ی خونی منطقه‌ای به طول 401 جفت باز تکثیر و با استفاده از دو آنزیم برشی متفاوت برش داده شد. با استفاده از آنزیم *Msp I* دو ژنوتیپ AA و AB به ترتیب با فراوانی‌های 0/6276 و 0/3724 و فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب 0/8138 و 0/1862 محاسبه شد. با استفاده از آنزیم *Tas I* سه نوع ژنوتیپ مختلف AA، AB و BB به ترتیب با فراوانی‌های 0/0962، 0/4647 و 0/4391 مشاهده و فراوانی آلل‌های A و B به ترتیب 0/3285 و 0/6715 برآورد شده بود.

اگر چه مطالعات ملکولی متعددی روی دام و طیور در ایران انجام شده است (7، 17، 18، 20، 21، 27، 35)، اما تاکنون ناحیه‌ی

کمپلکس اصلی سازگاری بافتی در مرغ‌های بومی ایـران زیـاد مـورد بررسی قرار نگرفته است، لذا در این پژوهش چندشکلی‌های آللـی در ناحیه‌ی کمپلکس اصلی سازگاری بافتی (MHC) دخیـل در سیسـتم ایمنی در برخی از نژادهای مرغ بومی موجود در ایران مـورد بررسـی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

انتخاب نمونه و جمع‌آوری نمونه‌های خون

در این پژوهش 200 نمونه‌ی خونی (هر جمعیت به تعداد 50 عدد) از چهار جمعیت پرورشی نـژادهـای مـرغ بـومی موجـود در موسسـه تحقیقات علوم دامی کشور شامل (مرندی، مازندرانی، عمومی[1]) و امور دام جهاد کشاورزی و منابع طبیعـی آذربایجـان غربـی (نـژاد بـومی آذربایجان غربی) به اندازه‌ی 2-1 میلی‌لیتر خون از سیاهرگ بالی اخذ گردید. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی ماده ضـد انعقـاد خـون در مجاورت یخ به آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه منتقـل و تـا زمـان شـروع اسـتخراج DNAی ژنـومی و آزمایش‌های بعدی، در دمـای 20- درجـه‌ی سـانتی‌گـراد نگـه داری شدند.

اسـتخراج DNAی ژنـومی و واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز (PCR)

استخراج DNAی ژنومی نمونه‌هـای خـون بـا اسـتفاده از روش بهینه شده‌ی نمکی ارائه شـده توسـط میلـر و همکـاران (16) انجـام گرفت. کمیت DNAهای ژنومی استخراج شده به روش طیف سنجی و با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ[2] و کیفیت آن‌ها با الکتروفـورز روی ژل آگارز دو درصد تعیین شد. جهت تکثیر قطعات ژنی مورد نظر برای هر جایگاه ژنی از یک جفـت آغـازگر اختصاصـی اسـتفاده شـد (جدول 1). اختصاصی بودن پرایمرهـای مـورد اسـتفاده، از سـرویس BLAST (Basice Local Alignment Search Tool) در سـایت NCBI بررسی شد.

واکنش PCR در حجم نهایی 20 میکرولیتر شـامل 200 - 100 نانوگرم DNAی ژنـومی، 4 میکرولیتـر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq DNA polymerase، بـافر، dNTPs، Red dye و $Mgcl_2$) (ســاخت شــرکت AMPLIQON) و 0/6 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشـت (سـاخت شـرکت BiONEER) با غلظت 10 پیکومول برای تکثیر منطقه‌ای از اگـزون شماره‌ی 2 به‌اندازه‌ی 374 جفت باز از جایگاه ژنی B-L، انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دمای واسرشته سازی اولیه 95 درجـه‌ی سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و 35 چرخه شامل واسرشته سازی ثانویه در دمای 97 درجه‌ی سانتی‌گراد بـه مـدت 60 ثانیـه، دمـای اتصـال آغازگرها 56 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه، دمـای تکثیـر 72 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 90 ثانیه و دمای تکثیر نهایی 72 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 8 دقیقه انجام گرفت.

تکثیر منطقه‌ای از اگزون شماره‌ی 2 جایگاه ژنی B-F به‌اندازه‌ی 1048 جفت بـاز، بـا اسـتفاده از واکـنش PCR در حجـم نهـایی 20 میکرولیتر شامل 200 - 100 نانوگرم DNAی ژنومی، 7 میکرولیتـر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و $Mgcl_2$) (ساخت شـرکت AMPLIQON) و 0/4 میکرولیتر از هر یـک از آغازگرهـای رفـت و برگشت (ساخت شرکت BiONEER) با غلظت 10 پیکومول انجـام گرفت. برای این جایگاه ژنی واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـراز بـا دمـای واسرشته سازی اولیه 95 درجه‌ی سانتی‌گراد به مـدت 5 دقیقـه و 30 چرخه شامل واسرشته سازی ثانویه در دمای 95 درجه‌ی سـانتی‌گـراد به مدت 60 ثانیه، دمای اتصال آغازگرها 60 درجه‌ی سانتی‌گـراد بـه مدت 45 ثانیه، دمای تکثیر 72 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه و دمای تکثیر نهایی 72 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه انجام شد.

همچنین تکثیر قسمتی از اگزون شماره‌ی 1 و اگزون شماره‌ی 2 به‌اندازه‌ی 401 جفت باز از جایگاه ژنی B-G بـا اسـتفاده از واکـنش PCR در حجـم نهـایی 20 میکرولیتـر شـامل 200 - 100 نـانوگرم DNAی ژنـومی، 7 میکرولیتـر Taq DNA polymerase 2X Master mix red (Taq DNA polymerase، بافر، dNTPs، Red dye و $Mgcl_2$) (ساخت شرکت AMPLIQON) و 0/4 میکرولیتـر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت (ساخت شرکت BiONEER) با غلظت 10 پیکومول انجام گرفت. برای این جایگـاه ژنـی واکـنش زنجیره‌ای پلیمراز با دمای واسرشته سازی اولیه 95 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و 35 چرخه شامل واسرشته سازی ثانویـه در دمـای 95 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، دمای اتصال آغازگرهـا 50 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، دمای تکثیر 72 درجه‌ی سانتی-گراد به مدت 30 ثانیه و دمای تکثیر نهایی 72 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 4 دقیقه انجام شد.

قطعات تکثیر شده برای هر جایگاه ژنی در حضور نشـانگر وزن مولکولی 100 جفـت بـازی (سـاخت شـرکت Thermo Scientific) روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شدند و صحت تکثیر قطعات مورد نظر بدون حضور باندهای غیراختصاصی و محصولات ناخواسته تائید شد (شکل 1).

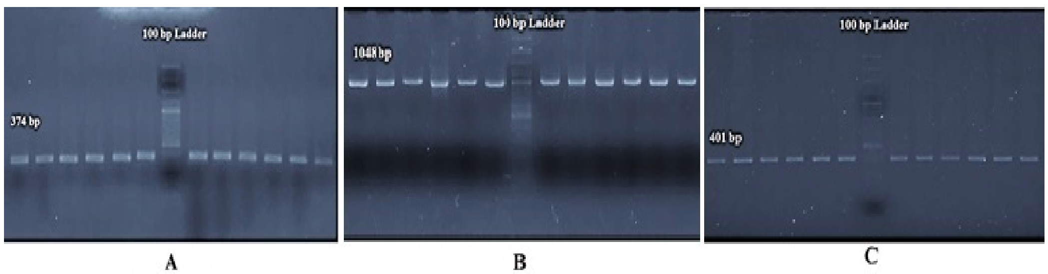
1- این گروه شامل توده‌های ژنتیکی مرغ‌های بومی کشور است و در نقاط مختلف کشور پراکنده بوده و به همین خاطر آن‌ها را مرغ‌های عمومی می‌نامند.

2- THERMO ND - 100 USA

جدول 1 - توالی آغازگرها، اندازه‌ی محصولات PCR و آنزیم‌های برشی برای هضم قطعات

Table 1 - Sequence of primers, the size of PCR products and restriction enzymes for fragments digestion

جایگاه ژنی locus	اندازه‌ی جایگاه ژنی Size of locus	آغازگر Primer	آنزیم برشی Restriction enzyme
B-L	374 bp	F: 5′-CAGCGTTCTTCTTCTGCGGT-3′ R: 5′-TCACCTTGGGCTCCACTGCG-3′	*Msp I* کیو و همکاران (33)
B-F	1048 bp	F: 5′-GCAGAGCTCCATACCCTGCG-3′ R: 5′-GGTGTGGTACGTGCCGTCGCC-3′	*Msp I* لیما روزا (12)
B-G	401 bp	F: 5′-TGTCTCTTCTTCACCTCCACC-3′ R: 5′-GCAGTTCTGTTCTCCCTTCAT-3′	*Msp I* کیو و همکاران (32)



شکل 1 - مشاهده‌ی محصولات PCR برای جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه (A: B-L، B: B-F و C: B-G) روی ژل آگارز دو درصد با نشانگر وزن مولکولی 100 جفت باز

Figure 1 - Observation of PCR products for studied loci (A: B-L, B: B-F and C: B-G) on %2 agarose gel with 100 bp molecular weight marker

در پژوهش حاضر از تکنیک PCR-RFLP جهت تعیین چند-شکلی جایگاه‌های ژنی مورد نظر استفاده شد و در این راستا برای هضم آنزیمی محصولات PCR از آنزیم برشی اختصاصی *Msp I* (ساخت شرکت Thermo Scientific) استفاده شد (جدول 1). این واکنش‌ها در حجم نهایی 15/5 میکرولیتر، شامل 5 میکرولیتر محصول PCR، 1 میکرولیتر بافر و 0/5 میکرولیتر آنزیم و در نهایت 9 میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام گرفت. واکنش‌های هضم آنزیمی برای سه جایگاه ژنی در دمای 37 درجه‌ی سانتی‌گراد و به مدت 16 ساعت انجام شد. بعد از هضم آنزیمی محصولات PCR، برای مشاهده‌ی باندها و تعیین الگوهای ژنوتیپی از ژل آگارز چهار درصد و نشانگر وزن مولکولی 50 جفت بازی (ساخت شرکت Thermo Scientific) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل ژنتیکی داده‌ها

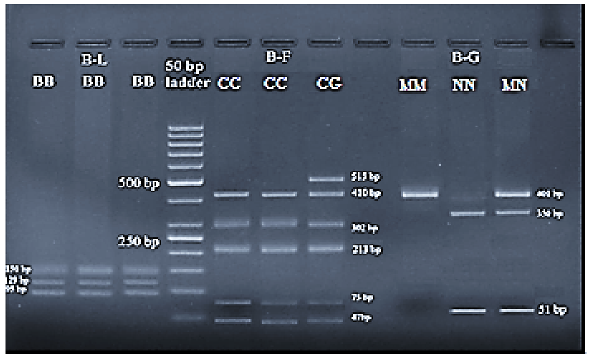
برای آنالیز ژنتیکی داده‌های دیپلوئیدی حاصل از هضم آنزیمی در جمعیت‌های مرغ بومی از نرم‌افزار POPGENE نسخه‌ی 1/32 (34) برای برآورد فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، متوسط هتروزیگوسیتی، تعادل هاردی - واینبرگ، شاخص تثبیت و شاخص اطلاعات شانون و دیگر پارامترهای ژنتیکی استفاده شد.

نتایج و بحث

بعد از هضم آنزیمی قطعه‌ی ژنی B-L، فقط سه باند 150، 129 و 95 جفت بازی و در نتیجه یک ژنوتیپ (BB) برای این قطعه‌ی ژنی در تمامی نمونه‌ها شناسایی شد. در قطعه‌ی ژنی B-F بعد از هضم آنزیمی دو نوع ژنوتیپ CG و GG برای تمامی نمونه‌ها شناسایی شد. آلل C شامل باندهای 515، 410، 75 و 47 جفت بازی و آلل G نیز دارای باندهای 410، 302، 213، 75 و 47 جفت بازی بودند. همچنین بعد از هضم آنزیمی قطعه‌ی ژنی B-G سه ژنوتیپ MM، MN و NN شناسایی شد که آلل M دارای باند 401 جفت بازی و آلل N دارای باندهای 350 و 51 جفت بازی بودند (شکل 2).

در تحقیق حاضر در مجموع 200 نمونه‌ی مرغ بومی برای سه جایگاه ژنی تعیین ژنوتیپ شدند. جایگاه ژنی B-L مونومورف بوده و در تمامی جمعیت‌ها فقط آلل B شناسایی شد (جدول 2) که با مطالعه‌ی صورت گرفته توسط سیوارامن و کومار (28) مطابقت داشت. آن‌ها این جایگاه ژنی به طول 267 جفت باز را با استفاده از سه نوع آنزیم برشی در دو نوع لاین مرغ‌های گوشتی برش داده که الگوهای برشی مونومورف به دست آمده بودند. در ضمن نتایج تحقیق ما با بررسی‌های اوه و همکاران (22) مطابقت نشان نداد. این محققین این جایگاه ژنی را در مرغ‌های بومی کره‌ای به طول‌های 427 و 651 جفت باز تکثیر و با آنزیم برشی *Hea III* برش داده و برای هر منطقه

مورد مطالعه سه نوع ژنوتیپ شناسایی کردند. احتمالاً تفاوت در نتایج مشاهده شده می‌تواند به دلیل استفاده از آنزیم‌های برشی متفاوت باشد.



شکل 2 - الگوهای ژنوتیپی مشاهده شده حاصل از هضمی آنزیمی محصولات PCR برای هر یک از جایگاه‌های ژنی مورد مطالعه روی ژل آگارز چهار درصد با نشانگر وزن مولکولی 50 جفت باز

Figure 2 - Observed genotypic patterns from enzymatic digestion of PCR products for studied loci on %4 agarose gel with 50 bp molecular weight marker

جدول 2 - فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، میانگین هتروزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی B-L در جمعیت مرغ‌های بومی مورد مطالعه

Table 2 - Allelic and genotypic frequencies, mean heterozygosity and observed and expected heterozygosity for B-L locus in studied indigenous chicken population

		نژاد Breed				کل جمعیت‌ها Total populations
	آلل و ژنوتیپ Allele and Genotype	عمومی Common	آذربایجان غربی W. Azarbaijan	مرندی Marandi	مازندرانی Mazandarani	
فراوانی آللی Allelic frequency	A	0	0	0	0	0
	B	1	1	1	1	1
فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (مورد انتظار) Genotypic frequency ob. (ex.)	AA	-	-	-	-	-
	AB	-	-	-	-	-
	BB	-	-	-	-	-
کای اسکور χ^2		-	-	-	-	-
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده Hetero. (Homo.) observed frequency		0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار Hetero. (Homo.) expected frequency		0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (1)
متوسط هتروزیگوسیتی Mean heterozygosity		0	0	0	0	0
شاخص اطلاعات شانون Shannon's Information index		0	0	0	0	0
شاخص تثبیت Fixation index		0	0	0	0	0

در جایگاه ژنی B-F بیشترین مقدار فراوانی آلل‌های C و G به ترتیب در جمعیت مرغ‌های بومی نژادهای عمومی (0/22) و

آذربایجان غربی (0/98) مشاهده شد و در کل جمعیت‌ها فراوانی هتروزیگوسیتی و هموزیگوسیتی مشاهده شده در این جایگاه ژنی به ترتیب برابر 25 و 75 درصد محاسبه شد. χ^2 محاسبه شده در این جایگاه ژنی برای تمامی جمعیت‌ها معنی‌دار نبود (P < 0/05) فلذا تمامی جمعیت‌ها در تعادل هاردی - واینبرگ قرار داشتند (جدول 3). این نتایج با تحقیق انجام شده توسط لیما روزا و همکاران (12) که با تکنیک متفاوت روی مرغ بومی برزیلی تخم آبی صورت گرفته بود، مطابقت نداشت. همچنین نتایج تحقیق ما با دو الگوی ژنوتیپی متفاوت CG و GG با نتایج مطالعه‌ی نیکبخت بروجنی و برجسته (21) که روی جمعیت مرغ مادر و هیبریدهای تجاری گوشتی آرین انجام گرفته بود، مطابقت نداشت. تکنیک‌های متفاوت و همچنین سویه‌های متفاوت مورد استفاده در تحقیقات، احتمالاً دلیل در تفاوت در نتایج خواهد بود.

در جایگاه ژنی B-G بیشترین مقدار فراوانی آلل‌های M و N به ترتیب مربوط به مرغ‌های بومی نژادهای آذربایجان غربی (0/44) و مازندرانی (0/84) بود. میانگین فراوانی آلل‌های M و N در کل جمعیت‌ها به ترتیب برابر با 0/28 و 0/72 و همچنین میانگین فراوانی‌های ژنوتیپ‌های MM، MN و NN به ترتیب 0/05، 0/47 و 0/48 برآورد شد. χ^2 محاسبه شده در این جایگاه ژنی برای جمعیت مرغ بومی نژاد مازندرانی معنی‌دار نبود (P < 0/05) و جمعیت ذکر شده در تعادل هاردی - واینبرگ قرا داشت. (جدول 4). این نتایج با نتایج تحقیق کیو و همکاران (32) که روی هشت نژاد مختلف از مرغ‌های بومی و مرغ‌های هیبرید تجاری گوشتی انجام شده بود، مطابقت نداشت. تفاوت در فراوانی ژنی و ژنوتیپی می‌تواند به دلیل منشاء متفاوت جغرافیایی این جمعیت‌ها یا سطوح مختلف انتخاب باشد. انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ، نشان دهنده‌ی تغییرات در فراوانی آللی در یک جمعیت است. این تغییرات را می‌توان به تعدادی از عوامل از جمله رانش ژنتیکی که در جمعیت‌هایی با تعداد افراد کم رخ می‌دهد، دانست.

جدول 3 - فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، میانگین هتروزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی B-F در جمعیت مرغ‌های بومی مورد مطالعه

Table 3 - Allelic and genotypic frequencies, mean heterozygosity and observed and expected heterozygosity for B-F locus in studied indigenous chicken population

	آلل و ژنوتیپ Allele and Genotype	نژاد Breed: عمومی Common	آذربایجان غربی W. Azarbaijan	مرندی Marandi	مازندرانی Mazandarani	کل جمعیت‌ها Total populations
فراوانی آللی Allelic frequency	C	0.22	0.02	0.04	0.21	0.12
	G	0.78	0.98	0.96	0.79	0.88
فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (مورد انتظار) Genotypic frequency ob. (ex.)	CC	0 (0.04)	0 (0)	0 (0)	0 (0.04)	0 (0.02)
	CG	0.44 (0.35)	0.04 (0.04)	0.08 (0.08)	o.42 (0.34)	0.25 (0.21)
	GG	0.56 (0.61)	0.96 (0.96)	0.92 (0.92)	0.58 (0.62)	0.75 (0.77)
کای اسکور χ^2		3.76 ns	0.01 ns	0.06 ns	3.33 ns	3.80 ns
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده Hetero. (Homo.) observed frequency		0.44 (0.56)	0.04 (0.96)	0.08 (0.92)	0.42 (0.58)	0.25 (0.75)
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار Hetero. (Homo.) expected frequency		0.35 (0.65)	0.04 (0.96)	0.07 (0.93)	0.33 (0.67)	0.22 (0.78)
متوسط هتروزیگوسیتی Mean heterozygosity		0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
شاخص اطلاعات شانون Shannon's Information index		0.52	0.09	0.16	0.51	0.37
شاخص تثبیت Fixation index		-0.28	-0.02	-0.04	-0.26	-0.13

Ns: Non significant (P < 0. 05)

جدول 4 - فراوانی‌های آللی و ژنوتیپی، میانگین هتروزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار برای جایگاه ژنی B-G در جمعیت مرغ‌های بومی مورد مطالعه

Table 4 - Allelic and genotypic frequencies, mean heterozygosity and observed and expected heterozygosity for B-G locus in studied indigenous chicken population

	آلل و ژنوتیپ Allele and Genotype	نژاد Breed: عمومی Common	آذربایجان غربی W. Azarbaijan	مرندی Marandi	مازندرانی Mazandarani	کل جمعیت‌ها Total populations
فراوانی آللی Allelic frequency	M	0.17	0.44	0.36	0.16	0.28
	N	0.83	0.56	0.64	0.84	0.72
فراوانی ژنوتیپی مشاهده شده (مورد انتظار) Genotypic frequency ob. (ex.)	MM	0.16 (0.03)	0.02 (0.19)	0 (0.12)	0 (0.02)	0.05 (0.08)
	MN	0.02 (0.28)	0.84 (0.50)	0.72 (0.47)	0.32 (0.27)	0.47(0.41)
	NN	0.82 (0.69)	0.14 (0.31)	0.28 (0.41)	0.68 (0.71)	0.48 (0.51)
کای اسکور χ^2		45.56*	24.12*	15.31*	1.68 ns	5.74*
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مشاهده شده Hetero. (Homo.) observed frequency		0.02 (0.98)	0.84 (0.16)	0.72 (0.28)	0.32 (0.68)	0.48 (0.52)
فراوانی هتروزیگوسیتی (هموزیگوسیتی) مورد انتظار Hetero. (Homo.) expected frequency		0.29 (0.71)	0.50 (0.50)	0.47 (0.53)	0.28 (0.72)	0.41 (0.59)
متوسط هتروزیگوسیتی Mean heterozygosity		0.37	0.37	0.37	0.37	0.37
شاخص اطلاعات شانون Shannon's Information index		0.45	0.68	0.65	0.43	0.59
شاخص تثبیت Fixation index		0.92	-0.70	-0.56	-0.19	-0.17

* Significant ($P < 0.05$)
Ns: Non significant ($P < 0.05$)

در نتایج به دست‌آمده از این تحقیق، در کل جمعیت‌ها، شاخص اطلاعات شانون در دو جایگاه ژنی B-L و B-G به ترتیب 0/37 و 0/59 و شاخص تثبیت به ترتیب 0/13- و 0/17- محاسبه شد. بیشترین مقدار شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده برای جایگاه‌های ژنی B-L و B-G به ترتیب برابر با 0/25 و 0/48 برآورد شد. برآورد شاخص تثبیت منفی در مرغ‌های مورد مطالعه می‌تواند به دلیل شدت انتخاب بالا در جمعیت‌ها باشد. شاخص تثبیت همیشه در محدوده‌ی 1- تا 1 متغیر است و منفی بودن آن نشانی از کاهش هتروزیگوسیتی و افزایش هموزیگوسیتی یا افزایش هم‌خونی و همچنین انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ در جمعیت‌ها باشد. شاخص اطلاعات شانون برآوردی از تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها است. در کل جمعیت‌های مورد مطالعه، جایگاه ژنی B-G دارای تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی بود.

نتیجه‌گیری کلی

چندشکلی‌های موجود در جایگاه‌های ژنی پل ارتباطی برای مطالعات روی پاسخ ایمنی ژنوتیپ‌های مشاهده شده جهت بهبود پاسخ ایمنی در مرغ‌های بومی است. طبق نتایج این تحقیق با توجه به وجود چندشکلی در دو جایگاه ژنی B-F و B-G، می‌توان از این جایگاه‌ها به عنوان نشانگر برای اصلاح نژاد ژنتیکی جهت افزایش مقاومت مرغ‌های بومی به بیماری‌ها استفاده کرد.

سپاسگزاری

این پژوهش با همکاری موسسه‌ی تحقیقات علوم دامی کشور، معاونت امور دام جهاد کشاورزی استان آذربایجان غربی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی و با مساعدت و همکاری آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه انجام گرفت. از همکاری بی‌دریغ همه‌ی همکاران و عزیزان مراکز یادشده کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

منابع

1- Bacon, L. D., H. D. Hunt, and H. H. Cheng. 2001. Genetic resistance to Mareks disease. Current Topics in Microbiology and Immunology, 255: 121-141.
2- Baghizadeh, A., M. Bahaaddini, M. R. Mohamadabadi, and N. Askari. 2009. Allelic variations in exon 2 of caprine MHC class II DRB3 gene in Raeini Cashmere goat. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 6(4): 454-459.
3- Boonyanuwat, K., S. Thummabutra, N. Sookmanee, V. Vatchavalkhu, and V. Siripholvat. 2006. Influences of major histocompatibility complex class I haplotypes on avian influenza virus disease traits in Thai indigenous chickens. Animal Science Journal, 77: 285-289.
4- Butter, C., K. Staines, A. Hateren, T. F. Davison, and J. Kaufman. 2013. The peptide motif of the single dominantly expressed class I molecule of the chicken MHC can explain the response to a molecular defined vaccine of infectious bursal disease virus (IBDV). Immunogenetics, 65: 609-618.
5- Davison, T. T. F., B. Kaspers, and K. A. Schat. 2008. Avian Immunology. 1st Ed. Elsevier Ltd, London, UK.
6- Dietert, R. R. 1987. The major histocompatibility complex as a communication gene complex. Poultry Science, 66: 774-775.
7- Esmailnejad, A., Gh. Nikbakht, N. Khazeni Oskoui, and F. Amini. 2015. Allelic segregation of major histocompatibility complex using LEI0258 microsatellite marker in indigenous and commercial chickens. Journal of Veterinary Research, 70(1): 101-107. (In Persian).
8- Hawken, R. J., C. W. Beattie, and L. B. Schook. 1998. Resolving the genetics of resistance to infectious diseases. Revue Scientifique Et Technique, 17(1): 17-25.
9- Hunt, H. D., S. Jadhao, and D. E. Swayne. 2010. Major histocompatibility complex and background genes in chickens influence susceptibility to high pathogenicity avian influenza virus. Avian Diseases, 54: 572-575.
10- Joiner, K. S., F. J. Hoerr, S. E. Van, and S. J. Ewald. 2005. The avian major histocompatibility Complex influences bacterial skeletal disease in broiler breeder chickens. Veterinary Pathology, 42: 275-281.
11- Jovanovic, S., M. savic, and D. zivkovic. 2009. Genetic variation in disease resistance among farm animals. Biotechnology in Animal Husbandry, 25(5 - 6): 339-347.
12- Lima-Rosa C. A. D. V., C. W. Canal, A. F. Streck, L. B. D. Freitas, A. Delgado-Canedo, S. L. Bonatto, and F. M. Salzano. 2004. B-F DNA sequence variability in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. Animal Genetics, 35: 278-284.
13- Lwelamira, J., G. C. Kifaro, P. S. Gwakisa, and P. L. M. Msoffe. 2008. Association of LEI0258 microsatellite alleles with antibody response against Newcastle disease virus vaccine and body weight in two Tanzania chicken ecotypes. African Journal of Biotechnology, 7: 714-720.
14- Malo, D. and E. Skamene. 1994. Genetic control of host resistance to infection. Trends in Genetics, 10: 365-371.
15- Miller, M. M., L. D. Bacon, K. Hala, H. D. Hunt, S. J. Ewald, J. Kaufman, R. Zoorob, and W. E. Briles. 2004. Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex. Immunogenetics, 56: 261-279.
16- Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, 16(3): 12-15.
17- Moazeni, S., M. R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Shahrbabak, A. Koshkoieh, and F. Bordbar. 2016a. Association between UCP gene polymorphisms and growth, breeding value of growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. Open Journal of Animal Sciences, 6(1): 1-8.
18- Moazeni, S. M., M. R. Mohammadabadi, M. Sadeghi, H. Moradi Shahrbabak, and A. K. Esmailizadeh. 2016b. Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. Journal of Livestock Science and Technologies, 4(2): 51-56.
19- Mohammadabadi, M. R., M. Nikbakhti, H. R. Mirzaee, A. Shandi, D. A. Saghi, M. N. Romanov, and I. G. Moiseyeva. 2010. Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. Russian journal of genetics, 46(4): 505-509.
20- Muhaghegh Dolatabady, M., A. Moradalipour, F. Mansori, F. Fattahy, and Z. Sallehi. 2019. Investigation of $FecX^I$, $FecX^H$ and $FecX^B$ polymorphism in BMP15 gene in Lac Qashqai and Bahmaei sheep breeds at Kohkiloueh and Boyerahmad province. Iranian Journal of Animal Science Research, 11(2): 247-257. (In Persian).
21- Nikbakht Brujeni, Gh. and N. Barjesteh. 2009. A study of the genotypic variability at the MHC (B-F) in Arian broiler chickens by PCR-SSCP. Journal of Veterinary Research, 64(1): 63-67. (In Persian).
22- Oh, J. D., M. H. Park, H. S. Kong, H. K. Lee, G. J. Jeon, S. H. Yeon, B. D. Sang, C. H. Choi, and B. W. Cho. 2005. Characteristics and improving breed of economic traits of Korea native chicken. Korean Journal of Poultry Science, 32(1, 3): 29-34.

23- Ri - Fu, X., L. Kui, C. Guo-Hong, Q. Yang-Zong, Z. Yu-Bo, L. Li, F. Bin, and L. Bang. 2006. Genetic polymorphism within exon 2 of MHC B-G gene in nine Chinese indigenous chicken breeds. Acta Zoologica Sinica, 52(1): 160-169.
24- Roitt, I. M. 1993. Fundamental Immunology. Raven Press, New York, USA.
25- Ruzina, M. N., T. A. Shtyfurko, M. R. Mohammadabadi, O. V. Gendzhieva, T. Tsendsuren, G. E. Sulimova. 2010. Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in the Mongolian, Kalmyk, and Yakut cattle breeds. Russian journal of genetics, 46(4): 456-463.
26- Schou, T. W., R. Labouriau, A. Permin, J. P. Christensen, P. Sorensen, H. P. Cu, V. K. Nguyen, and H. R. Juul-Medsen. 2010. MHC haplotype and susceptibility to experimental infections (*Salmonella Enteritidis*, *Pasteurella multocida* or *Ascaridia galli*) in a commercial and an indigenous chicken breed. Veterinary Immunology Immunopathology, 135: 52-63.
27- Shahdadnejad, N., M. R. Mohammadabadi, and M. Shamsadini. 2016. Typing of clostridium perfringens isolated from broiler chickens using multiplex PCR. Genetics in the 3rd millennium, 14: 4368-4374.
28- Sivaraman, G. K. and S. Kumar. 2005. PCR-RFLP chicken in BL-βII region of MHC of divergent broiler lines based on Immunocompetence Index. Journal of Applied Animal Research, 28: 81-84.
29- Suzuki, K., T. Matsumoto, E. Kobayashi, H. Uenishi, I. Churkina, G. Plastow, H. Yamashita, N. Hamasima, and T. Mitsuhashi. 2010. Genotypes of chicken major histocompatibility complex B locus associated with regression of Rous sarcoma virus J-strain tumors. Poultry Science, 89: 651-657.
30- Tizard, I. R. 2009. Veterinary Immunology. 8th Ed. Saunders Elsevier Ltd, New York, USA.
31- Weigend, S., S. Matthes, J. Solkner, and S. J. Lamont. 2001. Resistance to Marek's disease virus in White Leghorn chickens: effects of avian leucosis virus infection genotype, reciprocal mating, and major histocompatibility complex. Poultry Science, 80: 1064-1072.
32- Xu, R. F., K. Li, G. H. Chen, B. Y. Z. Qiang, D. L. Mo, B. Fan, C. C. Li, M. Yu, M. J. Zhu, T. A. Xiong, and B. Liu. 2005. Investigation of PCR-RFLPs within Major Histocompatibility Complex B-G genes using two restriction enzymes in eight breeds of Chinese indigenous chickens. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 18(7): 942-948.
33- Xu, R. F., K. Li, G. Chen, H. Xu, B. Qiang, Ch. Li, and B. Liu. 2007. Characterization of genetic polymorphism of novel MHC *B-LB*Ⅱ alleles in Chinese Indigenous chickens. Journal of Genetics and Genomics, 34(2): 109-118.
34- Yeh, F. C., Y. Rongcal, and T. Boyle. 2000. POPGENE 1.32. A free program for the analysis of genetic variation among and within populations using co-dominant and dominant markers. Department of Renewable Resources, University of Alberta, Alberta, Canada.
35- Zandi, E., M. R. Mohammadabadi, M. Ezzatkhah, and A. K. Esmailizadeh. 2014. Typing of toxigenic isolates of clostridium perfringens by multiplex PCR in Ostrich. Iranian Journal of Applied Animal Science, 4: 509-514.
36- Zekarias, B., A. H. M. T. Huurne, W. J. M. Landman, J. M. J. Rebel, J. M. A. Pol, and E. Gruys. 2002. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. Veterinary Research, 33: 109-125.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 11, No. 3, Fall 2019, p. 365-375

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 11، شماره 3، پاییز 1398، ص. 375-365

Genotype Analysis of the Major Histocompatibility Complex Region in Iranian Indigenous Chicken

J. Pish Jang Aghajeri[1]*- G. Rahimi Mianji[2]- S. H. Hafezian[3]- M. Gholizadeh[4]- G. Elyasi[5]

Received: 09-04-2018
Accepted: 21-06-2018

Introduction Chicken major histocompatibility complex (MHC) region are important in immune responses, resistance to diseases, and relationships with evolution processes. The chicken major histocompatibility complex is composed of two gene regions: the B and Y (Rfp-Y) loci, both located on micro chromosome 16. The B locus includes three gene classes, I (B-F), II (B-L) and IV (B-G). The chicken major histocompatibility complex, consists of several clusters of highly polymorphic genes, some of which are associated with disease resistance. The class I and class II antigens resemble their mammalian counterparts in the encoded protein structure. The class IV region encodes the B blood group antigens, which are readily identified by serological blood-typing. The class III region appears to be divided in chickens, with some elements that are MHC-linked and others that map elsewhere. In addition the Rfp-Y system, which bears a strong similarity to the MHC, maps to the opposite side of the nucleolar organizer region on the same micro chromosome as the MHC. Each class of MHC genes is a potential candidate for a role in disease resistance. The MHC genes show associations with response to diseases as diverse as virally induced neoplasia, bacterial, parasitic and auto-immune diseases.

Materials and Methods In this study, allelic polymorphism in B-L, B-F and B-G loci involved in the immune system in four Iranian indigenous chickens were examined using PCR-RFLP technique. Two hundred birds including common, West Azerbaijan, Marandi, Mazandarani indigenous chicken breeds were selected. As much as 1-2 ml of blood was taken from each of the chicken. Blood samples were transferred to the anticoagulant (Ethylene diamine tetra acetic acid) tubes in the vicinity of the ice to the genetic and biotechnological laboratory of Islamic Azad University, Maragheh branch and until the onset of genomic DNA extraction and subsequent experiments were kept at -20°C. In the extraction of the genomic DNA of blood samples, the salting out method and for amplify of each locus, a pair of specific primers was used. For detection of mutation in the loci the Msp I enzyme was used. For genetic analysis of data derived from digestive enzymes in indigenous chickens, POPGENE software version 1.32 was used. This software is used to estimate the allele and genotypic frequencies, observed and expected heterozygosity, mean heterozygosity, Hardy-Weinberg equilibrium, Fixation index, Shannon information index, and other genetic parameters.

Results and Discussion According to this study results, in the 374-bp locus of B-L, after enzymatic digestion, only BB genotype and monomorphic was detected. In the 1048 bp locus of B-F, two genotypes CG and GG were identified and the C allele included 515, 410, 75 and 47 bp bands, and the G allele also included bands of 410, 302, 213, 75 and 47 bp and the $\chi 2$ calculated in this locus was not significant for all populations ($P < 0.05$), and all populations were in Hardy-Weinberg equilibrium. Three Genotype MM, MN and NN genotypes were identified for the locus of B-G (401 bp), M allele included a 401 bp band and N allele included bands of 350 and 51 bp. The $\chi 2$ calculated in this locus was not significant for the indigenous chicken population of Mazandarani ($P < 0.05$) and this population was in Hardy-Weinberg equilibrium. The Shannon information index was calculated to be 0.37 and 0.59 in markers loci of B-F and B-G, respectively, and the fixation index values were -0.13 and -0.17, respectively. The highest observed heterozygosity index for B-L and B-G loci was 0.24 and 0.57, respectively. Estimation of the negative fixation index values in the studied chickens populations

1- Assistant Professor of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Maragheh branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.
2, 3 and 4- Professor, Associate Professor and Assistant Professor of Animal Science Department, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
5- Academic staff of Animal Science Department, East Azerbaijan Agriculture and Natural Resources Research Centre, Tabriz, Iran.
(*- Corresponding Author Email: parsa20012003@yahoo.com)

could be due to the high selection rate in the populations. The fixation index values is always variable in range -1 to 1, and its negativity indicates a decrease in heterozygosity and increase in homozygosity or increased inbreeding, as well as a deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium in the populations. Shannon's information index is an estimate of genetic diversity in populations. In all of the populations studied, the B-G locus has a relatively high genetic diversity.

Conclusion Regarding the polymorphism in the two gene sites (B-F and B-G) studied and the heterozygosity reduction in the populations studied, can be prevented from occurrence of non-random crosses in populations and prevented the reduction of heterozygosity and thus reduced genetic diversity. Also, by studying the immune responses associated with these two gene sites, from these genes can be used as marker for genetic breeding in indigenous chickens for increase of resistance to diseases.

Key words: Indigenous chicken, MHC, PCR-RFLP, Polymorphism.